

## Translation of Japanese Reference

## Science of Milk, Meat, and Egg

## 5 F. Characteristics of microorganisms used for fermented dairy products

A wide range of microorganisms are used for fermented dairy products, such as fermented milk, fermented butter, and cheese, and such organisms include the representative lactic acid bacteria, and certain other specific bacteria, yeast, and mold. The types of such microorganisms and their metabolic characteristics and utility will be described below.

10

## [1] Types of microorganisms used in dairy products

Table 4-16 shows examples of products that effectively use the various metabolic characteristics of microorganisms in the field of dairy products, and the types of microorganisms used exclusively as starter microorganisms for the various dairy products. While cheese and 15 fermented milk are the main dairy products that use microorganisms, fermented cream and fermented butter have been known from long ago, and recently, as a special example, products (such as sweet acidophilus milk) have appeared, that have been produced by simply supplementing drinking milk with a cell concentrate of microorganisms (mainly lactic acid bacteria) without accompanying fermentation step.

20 Cheese is made into its final product by a production process involving fermentation and ripening after curd preparation by maintaining a predetermined low temperature and high humidity level. Generally, lactic acid bacteria such as *Str. lactis*, *Str. thermophilus*, and *L. bulgaricus* are used for fermentation and ripening of hard (cheddar, Colby, Swiss, Gouda, Edam, etc.) and super-hard (Parmesan, Romano, etc.) cheeses, but Swiss cheese is characterized by the 25 addition of propionibacteria (for example, *Prop. shermanii*). On the other hand, aerobic bacteria or mold-yeast are often used besides lactic acid bacteria for semi-hard and soft cheeses. Representative surface ripened cheeses produced by aerobic bacteria (such as *Brevibacterium linens*) include brick, Tilsit, and Limburger cheeses, and among mold ripened cheeses, blue and Roquefort cheeses that use blue mold (for example, *P. roqueforti*) are well known and constitute 30 representative semi-hard or soft cheeses together with Camembert cheese that uses white mold (for example, *P. camemberti*).

35 Fermented milk is mostly produced based on the lactic acid fermentation process of lactic acid bacteria (such as *L. bulgaricus*, *L. acidophilus*, and *Str. thermophilus*), but bifidobacteria are also widely used these days. In contrast to such acid-fermented milk (so called acidified milk), alcohol-fermented milk (so called koumiss) uses alcohol fermentative yeast together with lactic acid bacteria.

According to Marshall (1984), there are four types of fermented milk in the world according to the microorganism used and the place of production. More specifically, they are Group I that includes Scandinavian butter milk, Ymer, and Villi, which are produced mainly in Northern Europe using *Str. lactis* subsp. *diacetylactis* or *Leuc. cremoris* (= *citrovorum*) as the main starter lactic acid bacteria, and also the American cultured butter milk; Group II that includes Bulgarian milk, acidophilus milk, and bifidus milk, which only use *Lactobacillus* as the starter and are produced in Bulgaria, and parts of Europe, as well as in America and Japan; Group III that includes yogurt and Dahi produced mainly in the Middle East and India, and also widely in leading dairy countries including Europe and America by mixing *Streptococcus* and *Lactobacillus*; and Group IV that includes kefir, koumiss, and Laban produced in the Soviet Union, Eastern Europe, Lebanon, and such using alcohol-fermentative yeast (for example, *Saccharomyces cerevisiae* and *Candida pseudotropicalis*) in addition to *Streptococcus* and *Lactobacillus*. Among them, the primary objective in Groups II and III is lactic acid fermentation, whereas in Group I the aim is flavor production, and in Group IV the aim is alcohol fermentation.

## [2] Metabolic characteristics of starter microorganisms

The above-mentioned various starter microorganisms used for fermented dairy products, each have distinctive metabolic characteristics, and among them, the major metabolites of starter microorganisms used for fermented milk are shown in Table 4-17. The main modes of metabolism of lactic acid bacteria including those in lactic acid bacteria-utilizing dairy products other than fermented milk are as listed in the left column of Table 4-18.

Table 4-17 Starter microorganisms for fermented milk and their major metabolites

Starter microorganism	Major metabolites	Starter microorganism	Major metabolites
Mesophilic bacteria		Thermophilic bacteria	
<i>Str. cremoris</i>	Lactic acid	<i>Str. thermophilus</i>	Lactic acid, acetaldehyde
<i>Str. lactis</i>	Lactic acid	<i>L. bulgaricus</i>	Lactic acid, acetaldehyde
<i>Str. lactis</i> subsp. <i>diacetylactis</i>	Lactic acid, diacetyl	<i>L. lactis</i>	Lactic acid
<i>Leuc. cremoris</i> ( <i>citrovorum</i> )	Lactic acid, diacetyl	Yeast	
<i>L. acidophilus</i>	Lactic acid	<i>Sacch. cerevisiae</i>	Ethanol, CO <sub>2</sub>
<i>L. brevis</i>	CO <sub>2</sub> , acetic acid, lactic acid	<i>Candida (Torula)</i> kefir	Ethanol, CO <sub>2</sub>
<i>L. casei</i>	Lactic acid	<i>Kluveromyces fragilis</i>	Acetaldehyde, CO <sub>2</sub>

(Marshall, 1984)

Table 4-18 Mode of metabolism of lactic acid bacteria and examples of utility associated with metabolism

Main mode of metabolism of lactic acid bacteria	Utility associated with metabolism of lactic acid bacteria
<ul style="list-style-type: none"> <li>- Lactic acid fermentation, homo- and hetero-fermentation, malolactic fermentation, phosphorolysis of lactose</li> <li>- Aroma production, production of diacetyl and acetoin from citric acid</li> <li>- Acetaldehyde accumulation (glucose-derived &amp; threonine-derived)</li> <li>- Proteolysis (amino acid production)</li> <li>- Amino acid degradation (organic acids, volatile fatty acids, carbonyl compounds, esters)</li> <li>- Sucrose --&gt; dextran production</li> <li>- Hippuric acid --&gt; benzoic acid</li> <li>- Isomerase (production of fructose from glucose)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Amino acid increase } Nutritional improvement</li> <li>- Vitamin B family increase }</li> <li>- Measures against intolerance due to decrease in lactose</li> <li>- Bactericidal action of lactic acid</li> <li>- Suppression of pathogenic bacteria by antibacterial substances</li> <li>- Antibacterial activity due to <math>H_2O_2</math> or benzoic acid production</li> <li>- Antagonistic action against pathogenic bacteria</li> <li>- Suppression of <math>B_1</math> deficiency by suppression of <math>B_1</math> decomposing bacteria</li> <li>- Preventive treatment against diarrhea, constipation, and production of putrefactive substances</li> <li>- Improvement of superinfection</li> <li>- Prevention and treatment of radiation injury</li> <li>- Retention of vaginal acidity and defense against vaginal infection</li> <li>- Nutritional improvement in the form of fermented milk for infants</li> <li>- Enteric colonization of useful lactic acid bacteria</li> <li>- Prevention of carcinogenesis by degradation of nitrosoamine</li> <li>- Prevention of development and progress of ascitic cancer</li> <li>- Intake as a lactic acid bacteria formulation</li> <li>- Decrease of cholesterol</li> </ul>

5 (a) Metabolic system for lactic acid fermentation

(1) Degradation of lactose

When lactic acid bacteria degrade lactose, the main metabolic system involved degrades lactose into glucose and galactose using  $\beta$ -galactosidase, then glucose enters the EMP pathway via glucose-6-phosphate, while galactose is converted to glucose-6-phosphate by the Leloir pathway, and then similarly enters the EMP pathway. Alternatively, in *Str. lactis*, *Str. cremoris*, and *L. casei*, tagatose pathway (so called because tagatose-6-phosphate is produced in the pathway) is also known, in which phosphate is added to lactose, then this is degraded to

galactose-6-phosphate and glucose, and then inserted into the middle of the EMP pathway.

(2) Production of lactic acid

There are two forms of lactic acid fermentation: homofermentation which produces more than 85% lactic acid, and heterofermentation which produces approximately 50% lactic acid and also  $\text{CO}_2$ , and acetic acid or ethanol. Meanwhile, since different bacterial strains carry different types of lactate dehydrogenases, any of the three optical isomeric forms of lactic acid, D(-) (levorotatory), L(+) (dextrorotatory), or DL (optically inactive), may be formed.

Except for the genus *Leuconostoc* and some strains of *Lactobacillus*, major lactic acid bacteria used for fermented dairy products carry out a homofermentation-type lactic acid fermentation, and their metabolic pathway is the EMP pathway that starts from glucose-6-phosphate and goes through pyruvic acid, and ultimately produces 4 M of lactic acid from 1 M of lactose. On the other hand, in heterofermentation, glucose-6-phosphate goes through phosphogluconic acid, and through the HMP pathway, produces lactic acid and  $\text{CO}_2$ , and also acetic acid under reductive conditions, and ethanol under oxidative conditions. In this case, 1 M of lactose produces 2 M each of lactic acid, acetic acid (or ethanol), and  $\text{CO}_2$ . Some strains of *Lactobacillus* such as *L. arabinosus* are known to carry out malolactic fermentation (used in wine production) which converts malic acid into lactic acid with a weak acidic taste.

(b) Metabolic system for aroma production

(1) Production of diacetyl and acetoin

Lactic acid production from pyruvic acid by the EMP pathway takes place only when it is accompanied by conversion of NADH, a byproduct produced during the pathway, to NAD. However, when NADH is insufficient, or when growth is weakened due to lack of amino acids, the reaction does not proceed, and some lactic acid bacteria such as *Str. lactis* subsp. *diacetylactis*, and *Leuc. cremoris* convert pyruvic acid to active aldehyde (thiamine pyrophosphate (TPP)-bound acetaldehyde) and further react this with the secondarily produced acetyl CoA ( $\text{CO}_2$  is produced as a byproduct) to produce diacetyl.

*Str. lactis* subsp. *diacetylactis*, and *Leuc. cremoris* cleave citric acid in raw milk to produce oxaloacetic acid and acetic acid, and oxaloacetic acid breaks down into pyruvic acid and  $\text{CO}_2$ . This step does not produce NADH; therefore, as described above, pyruvic acid is converted to active aldehyde and acetyl CoA, and then diacetyl is produced. Production of acetoin (with  $\text{CO}_2$  as a byproduct) from acetolactic acid that is produced from the reaction between pyruvic acid and active aldehyde is also known. The thus produced Diacetyl is reduced to acetoin in the presence of NADH, and similarly, acetoin is reduced to 2,3-butanediol to form the aroma of fermented milk and fermented butter. In alcohol fermentative yeast, acetaldehyde formed by decarboxylation of pyruvic acid is known to react with active aldehyde

to produce acetoin.

(2) Production of acetaldehyde

As described above, active aldehyde and acetyl CoA produced from pyruvic acid causes accumulation of acetaldehyde (release of TPP or production of CO<sub>2</sub> as a byproduct of 5 decarboxylation) depending on the bacterial strain and culturing conditions, and particularly in yogurt, conversion of acetyl CoA to acetaldehyde by *Str. thermophilus* is known to be pronounced. On the other hand, in *L. acidophilus* and *L. bulgaricus*, threonine produced by proteolysis is cleaved into glycine and acetaldehyde, and it is said that since NADH that reduces the latter into ethanol is insufficient, acetaldehyde accumulates.

10 This acetaldehyde is said to be the main substance in the flavor called yogurt smell found in yogurts, and combined use of the starter lactic acid bacteria described above will considerably increase this flavor. However, its excessive production is called green flavor, and its coexistence especially in fermented milk that has pronounced diacetyl/acetoin production becomes a defect.

15 (c) Metabolic system that accompanies proteolysis  
 (1) Amino acid production from proteins  
 Generally, proteins are degraded by proteinases into peptides, and furthermore by peptidases to amino acids. The ability of lactic acid bacteria to secrete such proteolytic 20 enzymes is weak, but extracellular, intracellular, and cell surface layer-bound proteases that have a neutral or slightly acidic optimal pH are known, and many of them show higher degradation activity in *Lactobacillus* than in *Streptococcus*. However, in the genus *Streptococcus*, bacterial 25 strains such as *Str. faecalis* subsp. *liquefaciens* are also known, which have strong proteolytic activity that liquify gelatin. Although the proteolytic character of lactic acid bacteria used for fermented milk is weak, the amino acids produced by degradation are indispensable to the growth of highly auxotrophic lactic acid bacteria, and a known example is threonine which is important for acetaldehyde production (see previous section).

30 Lactic acid bacteria play an important role in the ripening of cheeses, and molds belonging to the genus *Brevibacterium* and *Penicillium*, which are used for semi-hard and soft cheeses, produce potent proteases and shorten the ripening time. However, including lactic acid 35 bacteria, among the peptides produced as intermediates in the cheese ripening process, there are some that produce a bitter taste. Production of bitter-tasting peptides tends to take place when the ability to produce peptidases is lower than the ability to produce proteases, and the bitter taste is said to be related to the types of casein, and the amino acid cleavage sites when peptides are cleaved, and their sequences.

(2) Production of low-molecular weight compounds from amino acids

Various low-molecular weight compounds are produced from amino acids by enzymes produced by the starter microorganisms and some contaminating microorganisms.

Decarboxylation of amino acids produces amines and  $\text{CO}_2$ , and deamination produces fatty acids or keto acids, and  $\text{NH}_3$ . Volatile aldehydes are also produced in the Strecker degradation of amino acids, and together with non-enzymatic reactions among the produced substances, various flavor components such as fatty acids, keto acids, volatile carbonyl compounds, and volatile sulfur compounds, combine in a complex manner to complete the ripening of cheeses. In particular, the metabolic mechanism for cheeses ripened with aerobic bacteria or molds becomes all the more complex compared to that of hard cheeses produced only with lactic acid bacteria.

10

(d) Other metabolic systems

(1) Propionic acid fermentation

Propionibacteria (such as *Propionibacterium shermanii*) used for Swiss cheese produce pyruvic acid from glucose *via* the EMP or HMP pathway; meanwhile, lactic acid produced by lactic acid bacteria is converted to pyruvic acid by NAD-independent lactate dehydrogenase (LDH). The thus produced Pyruvic acid produces Propionic acid with methylmalonyl CoA or propionyl CoA as intermediates, and also produces acetic acid and  $\text{CO}_2$  as byproducts *via* acetyl CoA, to give this type of cheese its characteristic pungent flavor and gas holes (cheese eyes).

(2) Lipolysis and its byproducts

Milk fat triglyceride is degraded into fatty acid and glycerine by lipase in rennet and lipase produced by the starter microorganism to constitute the flavor of ripe cheese, and aerobic bacteria and molds are known to further convert fatty acids to other flavor components. In particular, in molds such as *P. roqueforti*, first, fat is degraded to fatty acid by lipase, involvement of  $\beta$ -oxidation thereafter produces ketoacyl CoA, then thiohydrolase produces  $\beta$ -keto acid, furthermore, decarboxylase produces methyl ketones, and reductase produces the corresponding alcohols. In addition, fatty acid esters and aldehydes are produced as byproducts.

(3) Dextran fermentation

*Leuc. dextranicum* breaks down sucrose into fructose and glucose, and polymerizes the glucose portion to produce dextran, which is a viscous sugar. In coffee-milk beverage dextran becomes a drawback in terms of stickiness, while it is useful as a blood substitute.

(4) Others

In addition to the above, in *Lactobacillus*, an enzyme system that cleaves hippuric acid in milk into benzoic acid and glycine is known, and an isomerase that can enhance sweetness by changing glucose into fructose is also known.

[3] Utility of lactic acid bacteria in fermented milk

Regarding the utility of fermented milk associated with lactic acid bacteria metabolism, research has advanced particularly in recent years since the postulation of Metchnikoff's theory of longevity, and various utilities such as those shown in the right column of Table 4-18 have been elucidated. First, in terms of nutritional effects, increase in amino acids due to proteolysis and increase in parts of the vitamin B family in fermented milk are known. In terms of health-maintaining and medical effects, conversion of lactose to lactic acid by fermentation is a measure that can be taken against lactose intolerance, and the produced lactic acid itself exhibits antibacterial effects against harmful intestinal bacteria.

Certain lactic acid bacteria provide preservative effects by producing H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> or benzoic acid (described above), and other known lactic acid bacteria-produced antibacterial substances including nisin (*Str. lactis*-produced thermostable peptide), an analogous diplococcin (produced by *Str. cremoris*), and acidophilin (produced by *L. acidophilus*). Regarding specific examples of applying fermented milk to lactic acid bacteria therapy, fermented milk has been clinically administered and has been found to be effective for aneurinase (a type of B<sub>1</sub> deficiency), diarrhea, constipation, dysentery, superinfection after administration of antibiotics, radiation injury, vaginal infection, burns, and such.

Recently, from animal experiments and clinical tests, it is becoming to be accepted that administration of fermented milk suppresses carcinogenesis due to nitrosoamine and development of ascitic cancer, and decreases blood cholesterol. Similar medical effects have been known in fermented milk that uses bifidobacteria, and effective examples such as prevention or treatment of intestinal diseases and liver diseases, increase in the lifespan of mice, and such have been reported.

[4] Breeding and modification of lactic acid bacteria and applications thereof

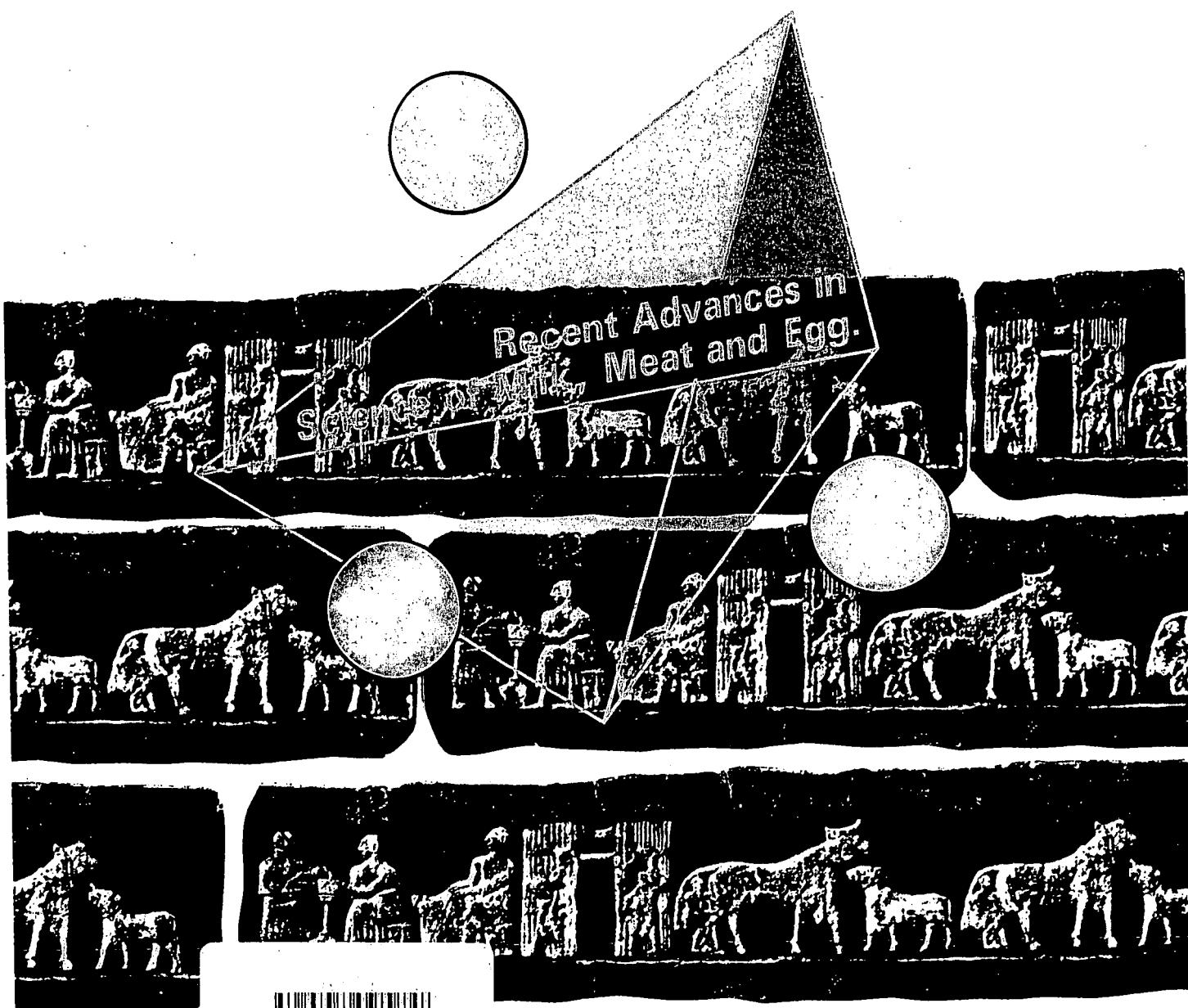
With the application of lactic acid bacteria in the field of biotechnology referred to as cell engineering and genetic engineering, quite recently, studies on attempts to breed and modify the metabolic characteristics of lactic acid bacteria are advancing. Among lactic acid bacteria, the first attempt to introduce such gene transduction to strains relating to fermented dairy products was gene transduction in *Str. lactis* and *Str. cremoris* carried out around 1962, and in the 1970's, various lactic acid bacteria plasmids were discovered. Plasmids are cyclic DNAs having a molecular weight of 10<sup>6</sup> to 10<sup>8</sup> (1 to 100 megadaltons) found outside the nucleus in bacterial cells, and functions found to be genetically transferred by the lactic acid bacteria plasmids are lactose fermentation activity, protease production, diacetyl production, antibiotics production, antibiotic resistance, specific mineral (for example, As and Cr) tolerance, and such. More specifically, since many of the metabolic characteristics of lactic acid bacteria deeply

involved in the production of fermented dairy products are present on the plasmid, it is becoming possible to produce lactic acid bacteria with high metabolic activity and to improve their production processes, such as fermentation, through gene transduction operations by breeding and modifying a useful type of lactic acid bacteria.

5 Methods for gene transduction include transformation, transduction, conjugation, protoplast (cytoplasm after eluting the cell wall) fusion, but in particular, transformation and protoplast fusion (also called cell fusion) have been attempted in lactic acid bacteria. However, at present, such breeding and modification have only proceeded to the stage of plasmid genetics such as those described above, and practical applications of breeding and modification by 10 extensive genetic engineering will be the next challenge.

# 乳・肉・卵の科学

農学博士 中江利孝 編著



08645



## F. 発酵乳製品に用いる微生物の特性

発酵乳、発酵バター、チーズなどの発酵乳製品に利用される微生物には代表的な乳酸菌を初めとして、その他的一部の特定細菌、酵母及びカビと広範囲にわたっている。その微生物の種類やその代謝特性と効用について以下に述べることにする。

### 〔1〕 乳製品に利用される微生物の種類

乳製品の分野で微生物のいろいろの代謝特性を有効に利用した製品と、その各種乳製品にスターー微生物として限定使用される微生物の種類の例は表4-16に示されている。微生物利用の乳製品はチーズと発酵乳を主力とするが、発酵クリームや発酵バターも古くから知られており、最近では特殊な例として飲用乳に微生物(主に乳酸菌)の菌体濃縮物を加えただけで発酵工程を伴わない製品(例えばスイートアシドフィラスマイルク)も登場してきている。

チーズは製造工程中の発酵とカード調製後所定の低温度と高湿度に保持する熟成によって最終製品化される。一般に硬質(チェダー、コルビー、スイス、ゴーダ、エダムなど)や超硬質(パルメザン、ロマノなど)、チーズの発酵と熟成には *Str. lactis*, *Str. thermophilus*, *L. bulgaricus* などの乳酸菌が使用されるが、スイスチーズの場合はプロピオノ酸菌(例えば、*Prop. shermanii*)も加味するのが特徴である。それに対して半硬質や軟質チーズには乳酸菌のほかに好気性細菌やカビ酵母がしばしば用いられる。好気性細菌(例えば、*Brevibacterium linens*)による代表的な表面熟成チーズにはブリック、チルジット、リンブルガーなどのチーズがあり、カビ熟成チーズでは青カビ(*P. roqueforti* など)使用のブルー、ロックフォールなどがよく知られ、白カビ(*P. camemberti* など)使用のカマンベールチーズとともに代表的な半硬質又は軟質チーズを構成している。

発酵乳は大部分乳酸菌(*L. bulgaricus*, *L. acidophilus*, *Str. thermophilus*など)の乳酸発酵工程を基本につくられるが、最近ではビフィズス菌も広く利用されるようになってきた。これらの酸発酵乳(いわゆる酸乳)に対してアルコール発酵乳(いわゆる乳酒)ではアルコール発酵性の酵母が乳酸菌とともに使用される。

Marshall(1984)によれば、世界の発酵乳には使用微生物と生産地域により4つのタイプがあるという。すなわち、北欧を中心に *Str. lactis* subsp. *diacetylactis* や *Leuc. cremoris*(=*citrovorum*)を主なスターー乳酸菌としてつくられるスカンジナビアンバターミルク、イメール(Ymer)、ビリ(Villi)、更にアメリカのカルチャードバターミルクの第Ⅰ群、ブルガリアや一部のヨーロッパ、更にアメリカや日本でつくられる *Lactobacillus* だけをスターーとするブルガリアンミルク、アシドフィラスマイルク、ビフィダスマイルクなどの第Ⅱ群、中東やインドを中心に広く欧米など酪農先進国を含めて *Streptococcus* と *Lactobacillus* を混合してつくられるヨーグルト、ダーヒ(Dahi)などの第Ⅲ群、ソ連、東欧、レバノンなどで *Streptococcus*, *Lactobacillus* のほかにアルコール発酵性酵母(例えば、*Saccharomyces cerevisiae* や *Candida*

*pseudotropicalis*)を用いてつくられるケフィア、クーミス、ラバン(Laban)などの第IV群である。そのうち第IIと第III群は乳酸発酵を主目的とするが、第I群は風味生成、第IV群はアルコール発酵をねらいとしたものである。

## [2] スターター微生物の代謝特性

発酵乳製品に用いる上記のような各種スターター微生物は、それぞれ特徴のある代謝特性をもっており、そのうち発酵乳に用いるスターター微生物の主な代謝産物は表4-17に示されている。また、発酵乳以外の乳酸菌利用乳製品を含めて乳酸菌の主な代謝様式は表4-18の左欄のとおりである。

表 4-17 発酵乳用スターター微生物とその主な代謝産物

スターター微生物	主な代謝産物	スターター微生物	主な代謝産物
中温性細菌		高温性細菌	
<i>Str. cremoris</i>	乳酸	<i>Str. thermophilus</i>	乳酸、アセトアルデヒド
<i>Str. lactis</i>	乳酸	<i>L. bulgaricus</i>	乳酸、アセトアルデヒド
<i>Str. lactis</i> subsp. <i>diacetylactis</i>	乳酸、ジアセチル	<i>L. lactis</i>	乳酸
<i>Leuc. cremoris</i> ( <i>citrovorum</i> )	乳酸、ジアセチル	酵母	
<i>L. acidophilus</i>	乳酸	<i>Sacch. cerevisiae</i>	エタノール、CO <sub>2</sub>
<i>L. brevis</i>	CO <sub>2</sub> 、酢酸、乳酸	<i>Candida</i> ( <i>Torula</i> ) <i>kefir</i>	エタノール、CO <sub>2</sub>
<i>L. casei</i>	乳酸	<i>Kluveromyces fragilis</i>	アセトアルデヒド、CO <sub>2</sub>

(Marshall, 1984)

表 4-18 乳酸菌の代謝様式と代謝に伴う効用の例

乳酸菌の主な代謝様式	乳酸菌の代謝に伴う効用	乳酸菌の主な代謝様式	乳酸菌の代謝に伴う効用
◦ 乳酸発酵、ホモ及びヘテロ発酵、マロラクチック発酵、乳糖の加リノ酸分解	◦ アミノ酸增加 ◦ ビタミンB群增加 ◦ 乳糖低減による不耐症対策 ◦ 乳酸の殺菌作用 ◦ 抗菌性物質による病原菌抑制 ◦ H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> や安息香酸生成による抗菌性 ◦ 病原菌との拮抗作用 ◦ B <sub>1</sub> 分解菌抑制によるその欠乏症の抑制 ◦ 下痢、便秘、腐敗性物	◦ ボニル化合物、エスター ◦ ショ糖→デキストラン生成 ◦ 馬尿酸→安息香酸 ◦ 異性化酵素（グルコースより果糖生成）	◦ 質生産の予防治療 ◦ 菌交代症の改善 ◦ 放射線障害の予防、治療 ◦ 腹の酸性保持、感染防禦 ◦ 乳児用発酵乳としての栄養改善 ◦ 腸内への有用乳酸菌の定着 ◦ ニトロソアミンの分解による発ガン予防 ◦ 腹水ガン発生と進行の予防 ◦ 乳酸菌製剤として服用 ◦ コレステロールの低減
◦ 芳香産生、クエン酸よりジアセチル、アセトイン生成			
◦ アセトアルデヒド蓄積（グルコース由来&スレオニン由来）			
◦ タンパク分解（アミノ酸生成）			
◦ アミノ酸の分解（有機酸、揮発性脂肪酸、カル			

### (a) 乳酸発酵の代謝系

(1) 乳糖の分解 乳酸菌が乳糖を分解する場合、その主な代謝系は  $\beta$ -ガラクトシダーゼによるグルコースとガラクトースへの分解後、グルコースはグルコース-6-リン酸を経てEMP経路に入るが、ガラクトースはルロワール(Leloir)経路によりグルコース-6-リン酸に転換されて同じくEMP経路に入る。*Str. lactis*, *Str. cremoris*, *L. casei* では別に乳糖の加リン酸後ガラクトース-6-リン酸とグルコースに分解され、EMP経路の途中に入るタガトース経路(中間でタガトース-6-リン酸生成のため)も知られている。

(2) 乳酸の生成 乳酸発酵には乳酸を85%以上生成するホモ発酵と乳酸約50%のほかに酢酸又はエタノールとCO<sub>2</sub>を生成するヘテロ発酵の2つの形式がある一方、菌種によって乳酸脱水素酵素の種類の相違からD(-)(左旋性), L(+)(右旋性)又はDL(不活性)の3種の光学異性乳酸をつくる。

主な発酵乳製品用乳酸菌は、*Leuconostoc*属や一部の*Lactobacillus*を除いてホモ発酵型乳酸発酵であり、その代謝経路はグルコース-6-リン酸からピルビン酸を経るEMP経路であり、結局、乳糖1Mから乳酸4Mが生成されることになる。一方、ヘテロ発酵ではグルコース-6-リン酸からフォスフォグルコン酸を経てHMP経路により乳酸とCO<sub>2</sub>のほかに還元的条件で酢酸、酸化的条件でエタノールを生成する。その場合、乳糖1Mからは乳酸、酢酸(又はエタノール)、CO<sub>2</sub>はそれぞれ2M生成することになる。なお、*L. arabinosus*など一部の*Lactobacillus*はリンゴ酸を酸味の弱い乳酸に変えるマロラクチック発酵(ワイン製造に利用)が知られている。

#### (b) 芳香産生の代謝系

(1) ジアセチルとアセトイソの生成 上記EMP経路によるピルビン酸からの乳酸生成はその経路途中で副生するNADHからNADH→NADを伴って初めて成立するが、NADHが不足したり、アミノ酸の不足で生育が弱化するとこの反応が進行せず、*Str. lactis* subsp. *diacetylactis*, *Leuc. cremoris*などの一部の乳酸菌はピルビン酸を活性アルデヒド(チアミンピロリン酸塩TPP結合アセトアルデヒド)に変え、それと更に二次生成するアセチルCoA(CO<sub>2</sub>を副生)と反応してジアセチルを生成する。

また、*Str. lactis* subsp. *diacetylactis*や*Leuc. cremoris*は牛乳中のクエン酸をオキザロ酢酸と酢酸に解裂し、オキザロ酢酸はピルビン酸とCO<sub>2</sub>に分解する。この過程ではNADHの生成がないため上述同様にピルビン酸→活性アルデヒドとアセチルCoAからジアセチルを生成する。また、ピルビン酸と活性アルデヒドの反応で生成するアセト乳酸からのアセトイソ生成(CO<sub>2</sub>副生)も知られている。このように生成したジアセチルはNADHの存在下でアセトイソに、同様にアセトイソは2,3-ブタンジオールに還元され、発酵乳や発酵バターの芳香を形成することになる。なお、アルコール発酵性酵母ではピルビン酸の脱炭酸ができるアセトアルデヒドが活性アルデヒドと反応してアセトイソをつくることも知られている。

(2) アセトアルデヒドの生成 前述のようにピルビン酸から生成する活性アルデヒドやアセチルCoAは、菌種や培養条件によりアセトアルデヒドを蓄積(TPP放出又は脱炭酸によるCO<sub>2</sub>副生)させることがあり、特にヨーグルトでは*Str. thermophilus*によるアセチルCoA→アセトアルデヒドが著しいことが知られている。一方、*L. acidophilus*や*L. bulgaricus*ではタンパク分解で生成するスレオニンをグリシンとアセトアルデヒドに解裂し、後者をエタノールに還元するNADHの不足のためアセトアルデヒドを蓄積するという。

ヨーグルト類でみられるヨーグルト臭とよばれる風味は、このアセトアルデヒドが本体といわれ、上記のようなスターター乳酸菌の併用でその風味が著しくなる。しかし、その過剰生成

はグリーンフレーバーといわれ、特にジアセチル・アセトイン生成を強調した発酵乳での共存は欠陥となる。

(c) タンパク分解に伴う代謝系

(1) タンパク質からのアミノ酸生成 一般にタンパク質はプロテイナーゼによってペプチドに、更にペプチダーゼによってアミノ酸に分解される。このようなタンパク分解酵素は乳酸菌では分泌能が弱いが、中性又はやや酸性側に至適pHをもった菌体外、菌体内又は細胞表層結合型のプロテアーゼが知られており、多くは *Streptococcus* に比べて *Lactobacillus* にその分解活性が高い。しかし、*Streptococcus* 属の中には *Str. faecalis* subsp. *liquefaciens* のようなゼラチンを液化する強力なタンパク分解力をもつ菌種も知られている。発酵乳に用いられる乳酸菌はタンパク分解性が弱いとはいえ、その分解生成アミノ酸は栄養要求性の高い乳酸菌の生育に不可欠なものもあり、スレオニンのようにアセトアルデヒド生成(前項参照)に重要なものも知られている。

チーズにおいては乳酸菌がその熟成に重要な役割を演ずるが、半硬質や軟質チーズに用いる *Brevibacterium* や *Penicillium* 属のカビは強力なプロテアーゼを産出して熟成を短縮させる。しかし、乳酸菌を含めてチーズ熟成過程では中間生成ペプチドの中に苦味を生成するものがある。その苦味ペプチド生成はプロテイナーゼよりもペプチダーゼ産出能の低い場合に起こりやすく、苦味はカゼインの種類やペプチドの解裂生成時のアミノ酸の切断個所とその配列に関係があるといわれている。

(2) アミノ酸からの低分子化合物の生成 アミノ酸はスターーター微生物や一部汚染微生物の産生する酵素によっていろいろの低分子化合物を生成する。アミノ酸の脱炭酸ではアミンと  $\text{CO}_2$  を生成し、脱アミノによって脂肪酸やケト酸と  $\text{NH}_3$  を生成する。また、アミノ酸のストレッカー分解では揮発性アルデヒドも生成され、生成物間の非酵素的反応も加わって、各種の脂肪酸、ケト酸、揮発性カルボニル化合物、揮発性硫黄化合物などの風味成分が複合的に重なった形でチーズの熟成を完結させる。特に好気性細菌やカビの熟成チーズでは乳酸菌だけの硬質チーズよりもその代謝機構が一層複雑となる。

(d) その他の代謝系

(1) プロピオン酸発酵 スイスチーズに用いるプロピオン酸菌(*Propionibacterium shermanii*等)はグルコースからEMP又はHMP経路を経てピルビン酸を生成する一方、乳酸菌の生成した乳酸をNAD非依存性乳酸脱水素酵素(LDH)でピルビン酸に変える。こうしてできたピルビン酸はメチルマロニルCoAやプロピオニルCoAを中間体としてプロピオン酸を生成するとともに、アセチルCoAを経て酢酸と  $\text{CO}_2$  を副生し、この種のチーズに独特な刺戟風味とガス孔(チーズアイ)を与えることになる。

(2) 脂肪分解とその副次生成物 乳脂肪トリグリセリドはレンネットの中のリパーゼとスターーター微生物産生のリパーゼによって脂肪酸とグリセリンに分解されて熟成チーズの風味を構成することになるが、好気性細菌やカビは更に脂肪酸を別の風味成分に変換することが知

られている。特に *P. roqueforti* などのカビではリパーゼでまず脂肪を脂肪酸に分解後、その  $\beta$ -酸化に関してケトアシル CoA、ついでチオヒドロラーゼで  $\beta$ -ケト酸、更に脱炭酸酵素でメチルケトン類を生成するとともに、レダクターゼによって相当するアルコール類をつくることがある。その他、副次的に脂肪酸エステル、アルデヒド類なども生成される。

(3) デキストラン発酵 *Leuc. dextranicum* はショ糖を分解して果糖とともに生成するグルコース部分を重合させて粘質糖類のデキストランを生成する。コーヒー乳飲料では粘質化の欠陥となるが、デキストランは代用血液として有用に向けられている。

(4) その他 以上のに他に *Lactobacillus* において牛乳中の馬尿酸を安息香酸とグリシンに解裂する酵素系が知られているほか、グルコースを果糖に変えて甘味を増強できる異性化酵素などが知られている。

### [3] 発酵乳における乳酸菌の効用

乳酸菌の代謝に伴う発酵乳の効用については、メチニコフの長寿説以来最近特に研究が進展し、表 4-18 右欄に示すような多くの効用が明らかにされてきている。まず栄養的効果として、発酵乳におけるタンパク分解によるアミノ酸増加や一部のビタミン B 群の增量が知られている。保健医療効果としては、発酵による乳糖の乳酸への転換は乳糖不耐症対策となり、生成乳酸そのものは腸内有害菌に殺菌効果を示す。

乳酸菌によっては  $H_2O_2$  や安息香酸(前述)を生成して防腐効果を与えるほか、ナイシン(*Str. lactis* 產生熱安定性ペプチド)、類似のディプロコッキン(*Str. cremois* 產生)、アシドフィリン(*L. acidophilus* 產生)などの乳酸菌產生の抗菌性物質も知られている。具体的な乳酸菌療法への発酵乳の応用例では、アノイリナーゼ(B<sub>1</sub> 欠乏症の一種)、下痢、便秘、赤痢、抗生物質投与後の菌交代症、放射線障害、膿感染、火傷などに臨床的に発酵乳が投与されて効果をあげている。

最近はまた発酵乳の投与が動物実験や臨床試験においてニトロソアミンによる発ガンや腹水ガンを抑えたり、血中コレステロールを低下させることが認められつつある。同様な医療効果はビフィズス菌使用の発酵乳でも知られており、腸疾患や肝疾患の予防又は治療、ネズミの寿命の延長などに有効例が報告されている。

### [4] 乳酸菌の育種改造とその応用

細胞工学や遺伝子工学といわれるバイオテクノロジーの分野に乳酸菌が応用され、その代謝特性を育種改造する試みは比較的最近に研究が進展しつつある。乳酸菌で発酵乳製品に関係する菌種において、このような遺伝子伝達を導入した最初の試みは1962年ごろの *Str. lactis* や *Str. cremoris* における形質導入であるが、1970年代に入って各種の乳酸菌プラスミドが発見された。プラスミドは菌体細胞内の核外にある分子量  $10^6 \sim 10^8$  (1~100 メガダルトン) の環状 DNA であり、乳酸菌のプラスミドにおいては、その遺伝的伝達機能として乳糖発酵性、プロテアーゼ活性などがある。

ゼ産生, ジアセチル産生, 抗生物質産生, 抗生物質耐性, 特定無機質(As, Crなど)耐性などが明らかにされてきた。つまり発酵乳製品製造上関係の深い乳酸菌の代謝特性の多くがプラスミド上に存在していることから, その遺伝子伝達操作を通して有用乳酸菌の育種改造による代謝活性の高い乳酸菌の作出や発酵などの製造工程の改善が可能になりつつある。

遺伝子伝達方法としては, 形質転換, 形質導入, 接合, プロトプラス (細胞壁を溶離させた細胞質) 融合があるが, 乳酸菌では特に形質転換とプロトプラス融合(又は細胞融合という)が試みられている。しかし, 現状では上記のようなプラスミド遺伝学の段階に留まっており, 本格的な遺伝子操作による育種改造の実用化は今後の問題といえよう。

## G. 微生物の防除法とその効果

### [1] 微生物防除のための各種の方法

一般に食品において汚染微生物を防除するためには, その食品の原料段階や製造工程中に汚染微生物を物理的又は化学的方法で死滅させるか, 又は物理的な手段で除去するかが実用面から研究開発されている。前者の死滅させる手段としては殺菌や滅菌という言葉がふつう用いられ, 後者の除去手段は除菌と表現される。

牛乳・乳製品の分野で実用化又は開発中の各種殺菌・滅菌の方法, その処理媒体と内容は表4-19に示すとおりである。大別して加熱による方法, その他の物理的方法及び化学的方法の3つがあり, 最も実用化が進み普及しているのが加熱殺菌又は滅菌法である。加熱処理法において処理媒体となる熱源には熱水と蒸気, 赤外線, 摩擦熱, マイクロ波などがあるが, 最も経済的で有効に利用されているのは熱水と蒸気である。しかし, その他の赤外線, 摩擦熱, マイクロ波加熱も限られた範囲で実用化されている。

その他の物理的殺菌・滅菌法では処理媒体として超音波, 紫外線, 放射線, レーザー光線が

表 4-19 牛乳・乳製品の各種殺菌・滅菌

種 別	処 理 媒 体	内 容
加熱による殺菌・滅菌	熱水と蒸気の利用	LTLT殺菌, HTST殺菌, UHT殺菌, UHT滅菌等, 二重殺菌又は滅菌法 サーミゼーション 太陽熱利用殺菌, 他 アクチネーター処理 ATAD法, 他 主に 2,450 MHz 使用
	赤外線の利用	
	摩擦熱の利用	
	マイクロ波の利用	
その他の物理的殺菌・滅菌	超音波の利用	牛乳への試用, 容器洗浄
	紫外線の利用	牛乳・乳製品, 容器の滅菌
	放射線の利用	牛乳・乳製品, 容器等の滅菌
	レーザー光線の利用	$N_2$ , Ar, He/Neレーザー
化学的殺菌・滅菌	$H_2O_2$ の利用	$H_2O_2$ 添加, $H_2O_2$ カタラーゼ処理
	リゾチームの利用	主にチーズ用原料乳への添加
	ナイシンの利用	主にチーズ用原料乳への添加
	ラクトフェリンの利用	生乳の保藏, 保存延長
	LPO-SCN- $H_2O_2$ の利用 その他	生乳の保藏, 保存延長 $KNO_3$ , ソルビン酸, $CO_2$ , その他

### 編著者略歴

中江 利孝 <なかえ としとか>  
東北大学農学部卒業、東京大学大学院博士課程修了。  
現 岡山大学農学部教授 農学博士  
主要著書 乳業ハンドブック(共著)、牛乳・乳製品  
世界のチーズ要覧、畜産ハンドブック(編)



### 乳・肉・卵の科学 —特性と機能—

1986年10月20日 初 版 発 行

定 価 5,000 円

---

編著者 中江 利孝

発行者 森田 悅郎

発 行 所

弘学出版株式会社

川崎市多摩区南生田 6-16-2 番地  
電 話 (044) 977-6438番 / 214  
Fax. (044) 976-6171番  
新灯印刷(株) 印刷 / (有)協栄製本 製本

---

© Toshitaka Nakae  
ISBN 4-87492-037-3 C3061